

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 9/12, C07K 15/00 A61K 37/02, 9/127, 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/05148 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. März 1993 (18.03.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02058 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. September 1992 (07.09.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 29 533.1 5. September 1991 (05.09.91) DE (71) Anmelder: MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstr. 10, D-3400 Göttingen (DE). (72) Erfinder: REDEMANN, Norbert ; ULLRICH, Axel ; Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18A, D-8033 Martinsried (DE).		(74) Anwälte: BEZOLD, Gunter usw. ; Maximilianstr. 58, D-8000 München 22 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: MUTATED GROWTH FACTOR RECEPTOR AS MEDICAMENT AND ITS USE FOR TREATING CANCER (54) Bezeichnung: MUTIERTER WACHSTUMSFAKTORREZEPTOR ALS ARZNEIMITTEL UND SEINE VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG VON KREBS (57) Abstract <p>Mutated receptor tyrosine kinases are useful as medicaments. These mutated growth factor receptors are particularly advantageous for treating cancerous diseases, in particular those types of cancer in which the overactivity of growth factor receptors play a role in the formation of the cancer, as well as for treating other diseases caused by receptor overactivity. Mutants of the EGF receptors in which the tyrosine kinase activity of the wild type receptor has been eliminated by punctual mutation or deletion in the tyrosine kinase domain are particularly effective medicaments for treating cancer.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft mutierte Rezeptortyrosinkinasen, die sich als Arzneimittel eignen. Besonders vorteilhaft sind die mutierten Wachstumsfaktorrezeptoren zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere von solchen Krebsarten, bei denen die Überfunktion von Wachstumsfaktorrezeptoren eine Rolle bei der Krebsentstehung spielt sowie von anderen Krankheiten, die auf der Überfunktion der Rezeptoren beruhen. Als besonders wirksames Arzneimittel zur Behandlung von Krebs werden Mutanten des EGF-Rezeptors offenbart, bei denen die Tyrosinkinaseaktivität des Wildtyp-Rezeptors durch eine Punktmutation oder Deletion in der Tyrosinkinase-Domäne eliminiert worden ist.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei		

Mutierter Wachstumsfaktorrezeptor als Arzneimittel und seine Verwendung zur Behandlung von Krebs

Die vorliegende Erfindung betrifft mutierte Rezeptor-tyrosinkinasen mit defekter Signalübertragungsaktivität, die therapeutische Eigenschaften besitzen, Arzneimittel enthaltend mindestens einen mutierten Rezeptor und die Verwendung des bzw. der mutierten Rezeptoren zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer unkontrollierten Überfunktion von Rezeptortyrosinkinasen assoziiert sind, insbesondere von Krebs.

Zellwachstum ist ein sorgfältig regulierter Prozeß in Abhängigkeit von den speziellen Bedürfnissen eines Organismus. Bei einem jungen Organismus überwiegt die Zellteilungsrate die Absterberate von Zellen, was zu einer Größenzunahme des Organismus führt. Bei einem ausgewachsenen Organismus sind die Neubildung von Zellen und der Zelltod so ausgewogen, daß ein "Fließgleichgewicht" entsteht. In seltenen Fällen bricht jedoch die Kontrolle der Zellvermehrung zusammen, und die Zellen beginnen zu wachsen und sich zu teilen, obwohl in dem Organismus kein spezieller Bedarf für eine höhere Anzahl von Zellen dieses Typs besteht. Dieses unkontrollierte Zellwachstum ist die Ursache von Krebs. Faktoren, die das unkontrollierte Zellwachstum verbunden mit Metastasenbildung hervorrufen können, sind oftmals chemischer Natur, können jedoch auch physikalischer Art, wie beispielsweise radioaktive Strahlung, sein.

Zur Therapie von Krebs stehen gegenwärtig im wesentlichen zwei Alternativen zur Verfügung. Entweder es gelingt, die Krebszellen durch einen operativen Eingriff vollständig aus dem erkrankten Organismus zu entfernen, oder es wird versucht, die entarteten Zellen im Organismus unschädlich

- 2 -

zu machen, wie beispielsweise durch Verabreichung von Medikamenten oder durch physikalische Therapieverfahren, wie Bestrahlung.

Bei der Chemotherapie werden häufig Medikamente eingesetzt, die in irgendeiner Form in den DNS-Stoffwechsel eingreifen und schnell wachsende Zellen, die eine höhere DNS-Stoffwechselleistung erbringen müssen, stärker schädigen als Zellen, die sich nicht oder nur langsam teilen. Ein schwerwiegender Nachteil vieler Chemotherapien ist jedoch die geringe Spezifität der verwendeten Wirkstoffe, was zur Folge hat, daß auch gesunde Zellen bei der Chemotherapie geschädigt werden. Diese geringe Spezifität der Wirkstoffe fordert weiterhin, daß deren Dosierung jeweils so erfolgen muß, daß möglichst wenig gesunde Zellen bei gleichzeitiger Abtötung der Krebszellen geschädigt werden. Dies ist oftmals nicht möglich, und der krebserkrankte Patient stirbt aufgrund der sich immer weiter ausbreitenden Krebszellen, die im Endstadium den Ausfall lebenswichtiger Funktionen herbeiführen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines weiteren Wirkstoffs mit wertvollen therapeutischen Eigenschaften, sowie eines Arzneimittels enthaltend den Wirkstoff, wobei der Wirkstoff bzw. das Arzneimittel besonders vorteilhaft sind bei der Behandlung von Krebserkrankungen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine mutierte Rezeptortyrosinkinase mit defekter Signalübertragungsaktivität, sowie durch ein Arzneimittel enthaltend mindestens eine mutierte Rezeptortyrosinkinase.

Zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung werden im folgenden die hierin verwendeten Begriffe näher erläutert.

- 3 -

Unter "Rezeptortyrosinkinase" wird jeder Rezeptor verstanden, der Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Der Ausdruck umfaßt Wachstumsfaktorrezeptoren, die Tyrosinkinaseaktivität besitzen, wie auch HER2 oder die met-Rezeptoren.

"Defekte Signalübertragungsaktivität" bedeutet, daß ein mutierter Rezeptor nicht mehr in der Lage ist, ein extrazelluläres Wachstumssignal oder ein anderes Signal in ein intrazelluläres Signal umzusetzen, so daß dieses Signal teilweise gehemmt oder vollständig blockiert ist.

"Wachstumsfaktor" bedeutet jede mitogene Chemikalie, üblicherweise ein Polypeptid, das von normalen und/oder transformierten Säugerzellen ausgeschieden wird, und das eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Zellwachstums spielt, insbesondere bei der Stimulierung der Proliferation der Zellen und dem Aufrechterhalten ihrer Lebensfähigkeit. Der Begriff "Wachstumsfaktor" umfaßt z.B. den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den von Plättchen stammenden Wachstumsfaktor (PDGF) und den Nervenwachstumsfaktor (NGF).

Unter "Wachstumsfaktorrezeptor" wird ein die Zellmembran überspannendes Polypeptid verstanden, das einen Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktor bindet und selbst eine Tyrosinkinaseaktivität in seinem intrazellulären Anteil enthält oder mit einer solchen assoziiert ist.

Unter "mutierter Rezeptortyrosinkinase" wird ein Tyrosinkinaserezeptor verstanden, der im Vergleich zu dem Wildtyp-Rezeptor eine Strukturänderung enthält, so daß der Rezeptor die Tyrosinkinaseaktivität des Wildtyp-Rezeptors nicht mehr besitzt.

Unter "mutiertem Wachstumsfaktorrezeptor" wird ein Wachs-

- 4 -

tumsfaktorrezeptor verstanden, der im Vergleich zu dem Wildtyp-Rezeptor eine Strukturänderung enthält, so daß der Rezeptor die Tyrosinkinaseaktivität des Wildtyp-Rezeptors nicht mehr besitzt.

Unter "Wildtyp-Wachstumsfaktorrezeptor" bzw. anderem "Wildtyp"-Rezeptor wird ein natürlich vorkommender Wachstumsfaktorrezeptor oder anderer Rezeptor verstanden, der Tyrosinkinaseaktivität besitzt und somit zur Signalübertragung fähig ist.

Unter "extrazellulärer Domäne" des Wachstumsfaktorrezeptors oder anderen Rezeptors wird der Teil des Rezeptors verstanden, der normalerweise aus der Zelle in die extrazelluläre Umgebung herausragt. Die extrazelluläre Domäne umfaßt beispielsweise den Teil des Rezeptors, an dem ein Wachstumsfaktor oder ein anderes Molekül bindet.

Unter "Transmembranregion" des Wachstumsfaktorrezeptors oder anderen Rezeptors wird der hydrophobe Anteil des Rezeptors verstanden, der normalerweise in der Zellmembran der Zelle lokalisiert ist, die den Rezeptor exprimiert.

Unter "Tyrosinkinasedomäne" oder "zytoplasmatischer Domäne" des Wachstumsfaktorrezeptors oder anderen Rezeptors wird der Teil des Rezeptors verstanden, der sich normalerweise innerhalb der Zelle befindet, und der die Transphosphorylierung von Tyrosinresten bewirkt.

Unter "einer wirksamen Menge" wird eine Menge der erfindungsgemäßen Zusammensetzung verstanden, die den gewünschten therapeutischen Effekt erzielen kann.

Unter "von Plättchen stammender Faktor (PDGF)" wird ein mitogenes Polypeptid verstanden, das in Blutplättchen enthalten ist, und das von Mesenchym stammende Zellen stimu-

- 5 -

liert und die autophosphorylierende Proteintyrosinkinaseaktivität stimuliert, wenn es an den PDGF-Wildtyp-Rezeptor bindet.

Unter "epidermalem Wachstumsfaktor (EGF)" wird ein mitogenes Polypeptid verstanden, das üblicherweise eine mitogene Antwort in Fibroblasten erzeugt und das die autophosphorylierende Proteintyrosinkinaseaktivität des EGF-Wildtyp-Rezeptors stimuliert.

Unter "auf Hyperplasie beruhende Krankheit" wird eine Krankheit eines Gewebes oder Organs verstanden, umfassend beispielsweise die Hautepidermis, das intestinale Epithelium, Hepatozyten, Fibroblasten, Knochenmarkszellen, andere Knochenzellen, Knorpel und glatte Muskulatur, wobei die Krankheit gekennzeichnet ist durch einen Anstieg in der Anzahl der Zellen des Gewebes oder Organs, wie z.B. Psoriasis und endometrische Hyperplasie.

Unter "HER2" wird eine Rezeptortyrosinkinase verstanden, die Sequenzhomologie zu dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor zeigt.

Unter "Liposomen" werden Partikel in einem wässrigen Medium verstanden, die durch Lipiddoppelschichten gebildet werden, die ein wässriges Milieu einschließen.

Unter "Überfunktion" wird eine überschüssige, unkontrollierte Aktivierung eines durch Wachstumsfaktorrezeptoren vermittelten Signalübertragungswegs verstanden, der zu einer überschüssigen Zellteilungsaktivität und anderen Konsequenzen führt, wie z.B. zu solchen, die bei einigen Krebszellen im Vergleich zu den normalen Zellen eines ähnlichen Zelltyps auftreten.

Unter "rekombinanten Vektoren" werden Vektoren verstanden,

- 6 -

die unter Verwendung von rekombinanter DNA-Technologie genetisch verändert wurden, um Nukleinsäurefragmente einzubauen, die für normale bzw. mutierte Rezeptortyrosinkinasen codieren. Die rekombinanten Vektoren können Zielzellen infizieren und die Zielzellen dazu veranlassen, die normalen bzw. mutierten Rezeptoren zu exprimieren.

Unter "rekombinanten retroviralen Vektoren" werden rekombinante Vektoren verstanden, die Retroviren sind.

Gemäß der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß mutierte Rezeptortyrosinkinasen wertvolle therapeutische Eigenschaften besitzen, die zur Behandlung von Krankheiten ausgenützt werden können, die mit einer Überfunktion von Rezeptortyrosinkinasen assoziiert sind, wobei die mutierten Rezeptoren insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen geeignet sind.

Wachstumsfaktorrezeptoren spielen bei der Entstehung und Vermehrung von menschlichen Krebszellen eine entscheidende Rolle. Bei gesunden Zellen sind die Wachstumsfaktorrezeptoren an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt. Das eigentliche Signal zur Zellteilung ist der Wachstumsfaktor, der in Abhängigkeit von den Bedürfnissen des Organismus gebildet wird. Der Rezeptor übernimmt die Funktion der Signalübertragung, d.h. er ist an der Umsetzung des extrazellulären Wachstumssignals in Zellteilungsaktivität im Innern der Zelle beteiligt. Bei vielen Wachstumsfaktorrezeptoren stellt deren Fähigkeit, nach Bindung des Wachstumsfaktors an die extrazelluläre Domäne Phosphatreste an Tyrosinreste in Proteinen zu übertragen, eine entscheidende Rolle dar. Diese Rezeptoren werden auch als Rezeptortyrosinkinasen bezeichnet. Eine Übersicht über Rezeptortyrosinkinasen befindet sich in Yarden, Y. und Ullrich A., Rev. Biochem. 1988, 57, 443-78. Die Dimerisierung des Wachstumsfaktorrezeptors nach

- 7 -

Bindung des Wachstumsfaktors ist ein weiterer wichtiger Vorgang bei dem Prozeß der Signalübertragung. Die Umwandlung eines extrazellulären Signals in ein intrazelluläres Signal unter Vermittlung von Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität läßt sich in die folgenden fünf Stufen zerlegen:

1. Die Bindung des Wachstumsfaktors (auch als Ligand bezeichnet) an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors induziert eine Konformationsänderung; diese bewirkt
2. Dimerisierung von Rezeptoren mit veränderter Konformation; mit
3. gleichzeitiger Induktion einer allosterischen Änderung der zytoplasmatischen Domäne, durch die wiederum die Kinaseaktivität induziert wird;
4. Transphosphorylierung von Tyrosinresten in dem Rezeptordimer, die wiederum eine aktivierte Rezeptorkonformation erzeugt und stabilisiert; und
5. Phosphorylierung von Polypeptidsubstraten und Wechselwirkung mit zellulären Faktoren.

Eine unkontrollierte Überfunktion dieser Signalübertragungskette aufgrund der Überexpression oder Mutation kann unter anderem zu einer überhöhten Teilungsaktivität der entsprechenden Zelle führen und im Extremfall zu einer entarteten Krebszelle. Eine Übersicht über Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Funktion bei der Signalübertragung von dem extrazellulären in das intrazelluläre Milieu, sowie der mögliche Einfluß von abnormal exprimierten Rezeptoren auf die Krebsentstehung ist in Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990) Cell 61, 203 - 212 gegeben.

- 8 -

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) ist ein 170 kD Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität (Ullrich et al. (1984), Nature 309, 418 - 425). Die molekularen Vorgänge, die an der Bindung seiner Liganden und Stimulierung seiner Kinaseaktivität beteiligt sind, sind ausführlich beschrieben in Ullrich et al., Cell (1990) 61, 203 - 212. Obwohl EGF normalerweise eine mitogene Antwort in Fibroblasten hervorruft, bewirkt die Überfunktion des Signalübertragungsvorgangs durch den EGF-Rezeptor aufgrund von überexprimierten Rezeptoren eine ligandenabhängige Transformation von NIH 3T3 Mauszellen (Riedel et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 1477 - 1481 und Di Fiore et al. (1987), Cell 51, 1063 - 1070)). Intensive klinische Studien haben die Funktion dieses Rezeptors bei der Entwicklung von bestimmten Carcinomen, wie Brustkrebs, Ovarienkrebs und Lungenzellkrebs, gestützt (Slamon et al. (1987), Science 235, 177 - 182 und (1989) Science 244, 707 - 712 und Kern et al. (1990) Cancer Res. 50, 5184 - 5191).

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die oben erläuterte fünfstufige Signalübertragungskette durch eine mutierte Rezeptortyrosinkinase blockiert bzw. gehemmt werden kann, wenn die mutierten Rezeptoren gemeinsam mit den Wildtyp-Rezeptoren von einer Zelle exprimiert werden. Somit eignen sich insbesondere mutierte Wachstumsfaktor-rezeptoren mit defekter Signalübertragungsaktivität als Arzneimittel, mit denen Krankheiten therapiert werden können, die im Zusammenhang mit einer gesteigerten Übertragung von Wachstumssignalen in das Zellinnere durch entsprechende Rezeptoren stehen.

Eine bevorzugte Rezeptormutante besitzt die Tyrosinkinaseaktivität des Wildtyprezeptors nicht mehr. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage, nach Ligandenbindung Tyrosinreste in dem Rezeptordimer oder in Polypeptidsubstraten zu phosphorylieren. Somit ist die Umsetzung des extrazellu-

- 9 -

lären Wachstumssignals in ein intrazelluläres Signal blockiert bzw. teilweise gehemmt.

Bereits eine Punktmutation in dem Wildtyprezeptor kann ausreichen, daß der Wildtyp-Rezeptor nicht mehr funktionsfähig ist, wenn er durch die Punktmutation die Tyrosinkinaseaktivität verloren hat. Eine solche Punktmutante (z.B. HERK721A) ist besonders bevorzugt.

Weiterhin bevorzugt ist ein mutierter Rezeptor, der eine Deletion in der Tyrosinkinasedomäne trägt, die zu einem Verlust der Tyrosinkinaseaktivität führt.

Es ist bevorzugt, daß der durch eine Deletion in der zytologischen Domäne mutierte Rezeptor die Transmembranregion jedoch noch enthält (z.B. HERCD-533). Mutierte Rezeptoren mit vorhandener Transmembranregion führen zu einer wirkungsvolleren Hemmung der Wachstumssignalübertragung und zeigen somit bessere therapeutische Wirkung als Rezeptoren ohne Transmembranregion, wie beispielsweise Mutanten, die nur aus den extrazellulären Domänen bestehen (z.B. Fig. 1, HERCD-566).

Besonders geeignet als Arzneimittel sind Mutanten von Rezeptortyrosinkinasen, wie beispielsweise von EGF-, PDGF-, IGF-I-, MET-Rezeptoren, EGF-Rezeptor verwandte Rezeptoren wie HER2-, neu-, C-erbB2-Rezeptoren oder NGF-Rezeptoren. Das MET-Protein ist beispielsweise ausführlich beschrieben in Giordano et al. (1988), Molec. Cell. Biol. 8, 3510 - 3517 und in Giordano et al. (1989) Nature, 339.

Ganz besonders geeignet ist ein mutierter Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF).

Bei einer besonders bevorzugten Mutante des EGF-Rezeptors

- 10 -

befindet sich an der Aminosäureposition 721 der Wildtyp-Rezeptorsequenz, eine Punktmutation. Bei einer bevorzugten Mutante ist der Lysinrest an Position 721 durch einen Alaninrest in der Mutante ersetzt. Diese Mutante ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH nach dem Budapester Vertrag hinterlegt unter DSM 6678. Bei einer weiteren bevorzugten EGF-Rezeptormutante sind die 533 C-terminalen Aminosäuren des Wildtyp-Rezeptors deletiert. Diese Mutante ist hinterlegt unter DSM 6679.

Die Rezeptormutanten sind nach den üblichen gentechnologischen Verfahren, wie beispielsweise in Sambrook, J. et al (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press beschrieben, ausgehend von den Wildtyp-Rezeptoren herstellbar.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel enthält mindestens einen der oben beschriebenen mutierten Rezeptoren und die üblichen Hilfs- und Trägerstoffe.

Besonders bevorzugt ist ein Arzneimittel, das den bzw. die Rezeptormutanten in Liposomen verpackt enthält. Um die Liposomen selektiv an das Zielgewebe, zu bringen, ist es vorteilhaft, wenn die Liposomen Antikörper in ihrer Membran enthalten, wobei die Antikörper spezifische Epitope der Zielzellen erkennen und selektiv an diese binden. Somit gelangen die Rezeptormutanten selektiv zu dem Zielgewebe und können dort ihre erwünschte Wirkung entfalten. Die Verabreichung von in Liposomen verpackten Wirkstoffen ist heute eine gängige Verabreichungsform.

Weiterhin bevorzugt ist ein Arzneimittel, das den bzw. die Rezeptoren in Form von einem bzw. mehreren rekombinanten retroviralen Vektoren enthält. Die rekombinanten Vektoren enthalten Nukleinsäurefragmente, die für den bzw. die

- 11 -

Rezeptoren codieren. Nach Verabreichung des Arzneimittels an den Patienten infizieren die Retroviren die Zielzelle und führen in dieser zur Expression der Rezeptormutanten.

Ein besonders bevorzugtes Arzneimittel enthält die für EGF-Rezeptormutanten codierenden retroviralen Vektoren pNTK-HER-K721A und/oder pNTK-HERCD-533, die hinterlegt sind bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroden Weg 1B, D-3300 Braunschweig, unter DSM 6678 bzw. DSM 6679.

Die mutierten Rezeptoren können in üblicher Weise in Arzneimittel eingebracht werden, wie beispielsweise beschrieben in Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A. Herausgeber) Mack Publishing Company, Easton, PA (1980) und Folgebände.

Die oben beschriebenen mutierten Rezeptoren bzw. die diese enthaltenden Arzneimittel sind besonders geeignet zur Behandlung von Krebs. Dabei sind solche Krebsarten besonders gut therapierbar, die Folge einer Überfunktion von Wachstumsfaktorrezeptoren sind. Zu diesen Krebsarten zählen insbesondere Brust-, Ovarien- und Lungenkrebs. Die Rolle von Oberflächenrezeptoren bei diesen Krebserkrankungen werden ausführlich beschrieben in Slamon, D.J. et al (1987), Science, 235, 177 - 182 und (1989) Science, 244, 707 - 712 sowie in Kern, J.A. et al (1990), Cancer Res., 50, 5184 - 5191.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann Salze, Puffer, Zusatzstoffe und andere Substanzen enthalten, die zum Verbessern der Wirksamkeit der mutierten Rezeptoren wünschenswert sind.

Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung umfassen sterile wäßrige oder nicht-wäßrige Lösungen, Suspensionen

- 12 -

und Emulsionen. Wäßrige Suspensionen zur Injektion können Substanzen enthalten, die die Viskosität der Suspension erhöhen, und umfassen beispielsweise Natriumcarboxymethylzellulose, Sorbit und/oder Dextran. Gegebenenfalls kann die Suspension Stabilisatoren enthalten. Beispiele für nicht-wäßrige Lösungsmittel sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle, wie Olivenöl, und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat.

Trägerstoffe oder Okklusivverbände können verwendet werden, um die Durchlässigkeit der Haut zu steigern und die dermale Adsorption des Arzneimittels zu erhöhen.

Flüssige Dosierungsformen können typischerweise eine Liposomenlösung umfassen, die die flüssige Dosierungsform enthalten. Geeignete Formen zum suspendieren von Liposomen umfassen Emulsionen, Suspensionen, Lösungen, Sirup und Elixiere mit inerten Verdünnungsmitteln, die üblicherweise auf diesem Gebiet verwendet werden, wie gereinigtes Wasser.

Neben den inerten Verdünnungsmitteln können diese Zusammensetzungen auch Zusatzstoffe, Benetzungsmittel, Emulgier- und Suspendiermittel oder Duftstoffe enthalten. Beispiele für weitere Materialien, die zur Verwendung in der vorliegenden pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet sind, werden in Remington' Pharmaceutical Sciences (Osol, A., Herausgeber), Mack Publishing Co., Easton, PA (1980) und Folgebänden angegeben.

Die Behandlung eines Individuums mit einem Tumor umfaßt das Verabreichen einer wirksamen Menge der mutierten Rezeptoren oder rekombinanten Vektoren, die die mutierten Rezeptoren herstellen, in einer einzigen Dosis, mehreren Dosen oder in Form einer Infusion an einem Patienten oder einem Tier.

- 13 -

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine "wirksame Menge" einer pharmazeutischen Zusammensetzung eine Menge, die ausreicht, den gewünschten biologischen Effekt zu erzielen. Im allgemeinen wird die Dosierung, die benötigt wird, um eine wirksame Menge der Zusammensetzung bereitzustellen, und die von einem Fachmann eingestellt werden kann, abhängen von Faktoren, wie dem speziellen zu verwendenden Rezeptor, dem Vorhandensein und der Art von anderen therapeutischen Mitteln, dem Alter des Patienten oder des Tiers sowie von dessen Zustand, Geschlecht und klinischem Status, einschließlich dem Ausmaß der Krankheit sowie weiteren Variablen.

Die bevorzugte Dosis der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung beim Menschen ist $> 10^9$ Plaque-bildende Einheiten (pfu) pro Person und hängt von der Krebsart und dem Ausmaß der Rezeptorüberfunktion ab.

Der bevorzugte Weg der Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgt parenteral. Der am meisten bevorzugte Weg erfolgt intravenös, intraperitoneal, topisch oder direkt in das Gehirn, die Rückenmarksflüssigkeit oder den Tumor selbst.

Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein nimmt man an, daß die beschriebenen Rezeptormutanten ihre Wirkung in den Zielzellen entfalten, indem die Mutanten neben dem Wildtyp-Rezeptor in die Membran der Zielzellen eingebaut werden, und die Rezeptormutante dann die Funktion des Wildtyp-Rezeptors beeinträchtigt, indem zur Signalübertragung inkompetente Dimere gebildet werden, die aus einem Wildtyp- oder onkogenen Rezeptor und einem mutierten Rezeptor mit defekter Signalübertragungseigenschaft bestehen.

- 14 -

Anhand von Mutanten des EGF-Rezeptors als Modell wird die vorliegende Erfindung näher erläutert.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Expression von EGF-Rezeptormutanten, die keine Tyrosinkinaseaktivität mehr besitzen, in transformierten Krebszellen, die den EGF-Wildtyp-Rezeptor exprimieren, den transformierten Phänotyp rückgängig machen kann.

Material und Methoden:

Herstellen von rekombinanten Retroviren

Die retroviralen Expressionsvektoren pN2, pNTK2 und pNTK-HERC sind ausführlich beschrieben in Keller, G. et al, (1985), Nature, 318, 149 - 154; Stewart, C.L. et al, (1987) EMBO J., 6, 383-388; von Rüden, T. und Wagner, E.F. (1988), EMBO J., 7, 2749-2756. pNTK-HER-K 721A wurde hergestellt durch Klonieren eines Bgl II-Fragments von CMVHER-K721A in pNTK-HERC. pNTK-HERCD-533 wurde hergestellt durch Erzeugen einer ClaI-Stelle an beiden Seiten des 2 kb großen Fragments XbaI/XhoI von pLSXNA 8, beschrieben in Livneh, E. et al, J. Biol. Chem, 260, 12490-12497, mittels üblicher Klonierungsverfahren, wie beschrieben in Sambrook, J. et al (1989), Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, und anschließend wurde das 2 kb ClaI Fragment mit ClaI gespaltenem pNTK2 ligiert. Das NTK-HERCD-566 Konstrukt wurde hergestellt durch Klonieren eines ClaI Fragments von CVNHERXCD in die ClaI-Stelle von pNTK2. Das Konstrukt ist hinterlegt unter DSM 6680. Ecotrophe rekombinante Retroviren wurden hergestellt aus der Helfervirus-freien Produzentenlinie GP+E-86, beschrieben in Markowitz D. (1988) J. Virol., 62, 1120-1124. Stabile GP+E-86 Produzentenlinien wurden erzeugt mittels eines modifizierten Infektions-

- 15 -

protokolls, wie beschrieben in Miller, A.D. und Buttimore, C. (1986) Mol. Cell. Biol., 6, 2895-2902. Amphotrophes Virus mit niedrigem Titer wurde hergestellt durch transiente Transfektion von retroviralen Expressionsplasmiden in die Helfervirus-freie Verpackungszelllinie PA317, beschrieben in Miller, A.D. et al (1985) Mol. Cell. Biol., 5, 431-437, und wurde verwendet, um sekundäre Verpackungszellen GP+E-86 zu infizieren, gefolgt von einer Selektion von Klonen der Produzentenlinie GP+E-86 in G418 (1 mg/ml). Der Virustiter wurde bestimmt durch Infizieren von NIH 3T3-Zellen mit Verdünnungsreihen von Retrovirus, die zellfreie GP+E-86 Überstände enthielten, und Bestimmung der Anzahl der G418 resistenten Kolonien. Ein Retrovirus (Ψ 2TGF α), das das Gen für den Tumorstromwachstumsfaktor α (TGF α) enthält, ist beschrieben in Blasband, A. J. (1990), Oncogene, 5, 1213-1221.

Gen-Transfer mittels Retroviren

Subkonfluente NIH 3T3-Zellen (10^5 Zellen/6cm-Platte) wurden mit Überständen von GP+E-86 Zellen, die hohe Titer an NTK-HERC Virus freisetzen (5×10^5 G418^R koloniebildende Einheiten pro ml), für 4 bis 12 Stunden in Anwesenheit von 4 μ g/ml Polybrene (Aldrich) inkubiert und anschließend in Überstand von GP+E-86 Zellen, die hohe Titer an entweder N2, NTK-HERK721A, NTK-HERCD-533 oder NTK-HERCD-566 Viren freisetzen. Der Expressionsspiegel der Rezeptoren wurde gesteigert durch mehrere Infektionsrunden, wie beschrieben in Bordignon, C. et al (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6748 - 6752. In den beschriebenen Experimenten wurde die Infektion einmal ausgeführt mit 1 ml eines verdünnten Überstands ($1,25 \times 10^5$ koloniebildende Einheiten) oder 1 bis 4 mal mit dem gleichen Volumen unverdünnten Überstands (5×10^5 koloniebildende Einheiten) von GP+E-86 Zellen, die hohe Titer von entweder N2,

- 16 -

NTK-HERK721A, NTK-HERCD-533 oder NTK-HERCD-566 Viren freisetzen.

Rezeptorphosphorylierung in intakten Zellen

Die wie oben infizierten Zellen wurden in 10cm-Platten bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert, gewaschen und für 16 Stunden in methioninfreiem DMEM (Gibco), ergänzt mit 1% FCS enthaltend 50 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin (Amersham), kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min mit 20 ng/ml EGF (Amgen Corp.) stimuliert und in 0,5 ml Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 10 mg/ml Aprotinin, 100 μM Natriumorthovanadat) bei 4°C lysiert. Die Lysate wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge bei rund 12000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden dann mit einem Überschuß an monoklonalem Antikörper 108.1, beschrieben in Honegger, A.M., Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 86, S. 925-929, und Protein A-Sepharose für 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Immunpräzipitate wurden zweimal mit HNTG (20 mM Hepes pH 7,3, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100 und 10% Glycerin) gewaschen. Das Pellet wurde in Probepuffer resuspendiert, für 5 min gekocht und anhand von SDS-PAGE (7,5%) analysiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf Nitrozellulose übertragen und anschließend mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen Phosphotyrosin (5 E2), beschrieben in Fendly, B.M. et al (1990) Cancer Research, 50, 1550-1558, inkubiert. Zum Nachweis wurde der Nitrozellulosefilter mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper inkubiert, gefolgt von einer ECL-Substrat-Reaktion (Amersham). Nach der Detektion der ECL-Substratreaktion mit Kodak X-Omat-Film wurden die Nitrozellulosefilter mit PBS, enthaltend 0,2% Tween20, gewaschen. Anschließend wurden die ^{35}S -Methionin-markierten

- 17 -

Proteine mittels Autoradiographie nachgewiesen. Die Dichte der Banden wurde durch Densitometrie ermittelt.

[³H] -Thymidin-Einbau

Subkonfluente NIH 3T3 Zellen (10^5 Zellen/6cm-Platte) wurden wie beschrieben koinfiziert mit NTK-HERC, gefolgt von 4 Infektionsrunden mit entweder N2, NTK-HERK721A, NTK-HERCD-533 oder NTK-HERCD-566. Die Zellen wurden aufgeteilt auf 12-Loch Costarplatten. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellmonolayer für 24 Stunden in 0,5 ml DMEM, 0,5% FCS ausgehungert, und 18 Stunden nach EGF-Zusatz wurden die Zellen mit 0,5 μ Ci Methyl[³H]-thymidin (Amersham) für 4 Stunden markiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10% TCA für 1 Stunde auf Eis präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 10% TCA gewaschen und in 200 μ l 0,2 N NaOH/0,2% SDS wieder aufgelöst. Die Lysate wurden neutralisiert, und die eingebaute Radioaktivität durch Scintillationszählung quantitativ bestimmt.

Transformations-Tests

Um die Fähigkeit von NIH 3T3 Zellen zur Koloniebildung in Weichagar zu untersuchen, wurden subkonfluente NIH 3T3 Zellen (10^5 Zellen /6cm-Platte) mit NTK-HERC, gefolgt von 4 Runden der Infektion mit entweder N2, NTK-HERK721A, NTK-HERCD-533, oder NTK-HERCD-566 infiziert. In den Fällen, in denen eine autokrine Stimulierung zu erzeugen war, wurden die Zellen infiziert mit Ψ 2TGFA- Virus (5×10^4 G418^R koloniebildende Einheiten pro ml). NIH 3T3 Zellen (10^5) wurden in 6cm-Platten ausplattiert in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 10 ng/ml EGF in 3 ml Medium zum Überschichten (top layer) aus MEM, enthaltend 10% FCS und

- 18 -

0,2% Agar (Gibco). Die Bodenschicht enthielt MEM, 10% FCS und 0,4% Agar. Sichtbare Kolonien wurden nach 4 Wochen gezählt.

Für Focibildungstests wurden subkonfluente NIH 3T3 Zellen (10^5 Zellen/6cm-Platte) koinfiziert mit NTK-HERc (1×10^4 G418^R koloniebildende Einheiten pro ml), gefolgt von 4 Runden der Infektion mit entweder N2, NTK-HERK721A, NTK-HERCD-533, oder NTK-HERCD-566 Viren. In einigen Experimenten wurden die Zellen superinfiziert mit Ψ 2TGFA-Virus (1×10^3 G418^R koloniebildende Einheiten pro ml). Infizierte Zellen wurden auf 6cm-Platten mit DMEM, enthaltend 4% FCS, in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 10 ng/ml EGF kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Die Platten wurden mit Kristallviolett angefärbt und die Foci wurden am Tag 18 gezählt.

Legenden zu den Figuren

Fig. 1: Schematische Darstellung des menschlichen EGF-Wildtyp-Rezeptors und mutierte EGF-Rezeptoren. Die Lage von cysteinreichen Domänen (cys), der Tyrosinkinase (TK)- und der Transmembran(TM)-Domäne sind angegeben. Die Mutante HERK721A trägt eine Punktmutation an Position 721 (ein Austausch von Lysin gegen Alanin), während HERCD533 und HERCD-566 C-terminale Deletionen von 533 bzw. 566 Aminosäuren tragen. Die Mutanten sind ausführlich beschrieben in Livneh, E., et al (1986) J. Biol. Chem., 260, 12490-12497 und Honegger, A.M., et al (1987) Cell, 51, 199-209.

Fig. 2 (A): Tyrosinphosphorylierung des Wildtyp- und mutierten EGF-Rezeptors. Zellen, die entweder den Wildtyp-Rezeptor alleine oder den Wildtyp-Rezeptor und mutierte Rezeptoren coexprimieren, wurden über Nacht mit

- 19 -

[³⁵S] Methionin markiert und anschließend in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 2 ng/ml EGF für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden in Lösung gebracht und mit Anti-EGF-Rezeptor-Antikörper (mAb 108) präzipitiert, durch SDS-PAGE getrennt und immunologisch mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern (5E2) analysiert, gefolgt von einer ECL-Substratreaktion.

(B): Expression des EGF-Rezeptors auf NIH 3T3 Zellen. Zellen, die entweder den Wildtyp-Rezeptor alleine oder den Wildtyp-Rezeptor und mutierte Rezeptoren coexprimieren, wurden über Nacht mit [³⁵S] Methionin markiert und anschließend in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 ng/ml EGF für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden in Lösung gebracht und mit Anti-EGF-Rezeptor-Antikörper (mAb108) präzipitiert, getrennt mit Hilfe von SDS-PAGE und immunologisch mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (5E2) nachgewiesen, gefolgt von einer ECL-Substrat-Reaktion. Das ECL-Substrat wurde abgewaschen mit PBS, enthaltend 0,2% Tween 20, und die ³⁵S Methionin-markierten Proteine wurden durch Autoradiographie nachgewiesen.

Fig. 3: EGF-simulierter [³H]-Thymidin-Einbau. In Zellen, die entweder den Wildtyp-Rezeptor alleine (gestrichelte Linie) oder Wildtyp-Rezeptor und mutierte Rezeptoren coexprimierten, wie in A: Wildtyp-EGF-Rezeptor + K721A, B: Wildtyp EGF-Rezeptor +CD-533, C: Wildtyp EGF-Rezeptor + CD-566 wurden in 12-Loch Costarplatten bis zur Konfluenz kultiviert und für 2 Tage in DMEM, enthaltend 0,5% FCS, ausgehungert. 10% FCS oder verschiedene EGF-Konzentrationen wurden zugesetzt und 18 Stunden nach dem EGF-Zusatz wurde [³H]Thymidin (0,5 µCi/Loch für 4 Stunden zugesetzt, und dessen Einbau in DNA wurde bestimmt. Die mitogene Antwort wurde aufgezeichnet, um die Beziehung zwischen Dosis und Antwort aufzuzeigen. Die Werte wurden um den basalen Thymidin-Einbau korrigiert,

- 20 -

und die maximal beobachtete Antwort auf EGF wurde als 100% definiert. Die ausgefüllten Dreiecke geben den halbmaximalen Thymidin-Einbau an.

Ergebnisse:

Zellen, die den Wildtyp-Rezeptor alleine oder zusammen mit den mutierten Rezeptoren exprimieren, wurden mit [35 S]Methionin markiert, inkubiert in der Anwesenheit oder Abwesenheit von EGF für 10 min, lysiert und immunpräzipitiert mit einem Maus-Antikörper gegen humanen EGF-Rezeptor (mAb108). Die Proben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen, und die Tyrosinphosphorylierung wurde nachgewiesen mit Hilfe des phosphotyrosinspezifischen Mausantikörpers 5E2 (Fig. 2A). Die Menge des in dem Immunpräzipitat vorhandenen Rezeptors wurde durch Autoradiographie desselben Nitrozellulosefilters nachgewiesen (Fig. 2B).

Wie in Fig. 2A, Spuren b und c, gezeigt, induziert der EGF-Zusatz zu intakten NIH 3T3 Zellen, die mit dem Virus, enthaltend den Wildtyp EGF-Rezeptor, infiziert sind, eine starke Tyrosinphosphorylierung der 170 kD EGF-Rezeptorbande. Durch Phosphorylierung nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit des EGF-Rezeptors in der SDS-PAGE, verglichen mit dem unphosphorylierten EGF-Rezeptor, ab, wie ersichtlich aus Fig. 2B, Spuren b und c. Der Spiegel der EGF-stimulierten Phosphorylierung des Wildtyp-Rezeptors wurde nicht verringert durch die Coexpression der löslichen extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors, wie durch das NTK-HERCD-566 Virus Genom codiert, selbst wenn die extrazelluläre Domäne in 4fachem Überschuß zu dem Wildtyp-Rezeptor exprimiert wurde (Fig. 2A, Spuren d bis f; Fig. 2B, Spuren d bis f).

- 21 -

Im Gegenteil, in einem analogen Experiment, bei dem ein Virus, das die membranständige EGF-Rezeptor-Deletionsmutante HERCD-533 (Fig. 1) exprimiert, verwendet wurde, erfolgte eine starke dosisabhängige Hemmung der EGF-induzierten Phosphorylierung des Wildtyp-EGF-Rezeptors (Fig. 2A, Spuren g bis i), obwohl der Spiegel des 170 kD EGF-Rezeptorproteins konstant blieb (Fig. 2B, Spuren g bis i). Die Intensität der Tyrosin-phosphorylierten Banden nahm von 100% auf 71% bzw. 30% ab. Unter diesen Bedingungen zeigte der EGF-Rezeptor die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften wie ein nicht-phosphorylierter Rezeptor (Fig. 2B, Spur i), was in Übereinstimmung mit seinem Zustand der Tyrosinphosphorylierung, nachgewiesen durch mAb 5E2 (Fig. 2A, Spur i), ist.

Wenn der Wildtyp-Rezeptor mit der kinasenegativen Mutante HERK721A coexprimiert wurde, wurde eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung der 120 kD-Bande nachgewiesen (Fig. 2A, Spuren k bis m). Die Intensität des Signals der Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors wuchs von 251 % auf 337% bzw. 450% an, gemäß der densitometrischen Analyse der Autoradiographien. Da der Wildtyp-Rezeptor und die Kinase-negative Mutante von gleicher Größe sind, stellt das erhöhte 170 kD-Signal in Fig. 2B, Spuren k bis m, die Summe der Phosphorylierung beider Rezeptoren dar, da der mutierte Rezeptor durch den Wildtyp-Rezeptor transphosphoryliert werden kann.

Hemmung der EGF-induzierten Zellteilungsrate.

EGF stimuliert die Zellteilung in NIH 3T3 Fibroblasten, die den EGF-Rezeptor exprimieren, wie beschrieben in Riedel, H. et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1477-1481 und Prywes, R. et al (1986) EMBO J., 5, 2179-2190. Der Einfluß von mutierten Rezeptoren auf die von dem

- 22 -

EGF-Wildtyp-Rezeptor kontrollierte Zellteilung wurde anhand der Induktion der DNA-Synthese bestimmt.

Die DNA-Synthese wurde in Zellen, die mit dem NTK-HERC Virus und der N2-Virus-Kontrolle infiziert waren, als [³H]-Thymidin-Einbau bestimmt, und die Synthese war maximal stimuliert bei 2 ng/ml EGF, mit einer halbmaximalen Stimulierung (ED₅₀) bei 0,66 ng/ml (Fig. 3). Ähnlich zu früheren Ergebnissen, wie beschrieben in Honegger, A.M. et al (1988) EMBO J., 7, 3045-3052, und Riedel, H., et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 1477-1481, führten höhere EGF-Konzentrationen zu niedrigeren Spiegeln des [³H]-Thymidin-Einbaus, wie in Fig. 3 angezeigt. Die Coexpression des EGF-Rezeptors mit HERCD-533 und HERK721A führte nach vier Runden der Infektion mit den entsprechenden Viren zu einer deutlichen Verschiebung der dosisabhängigen Kurve zu höheren EGF-Konzentrationen hin (Fig. 3A und B). Dies zeigt an, daß die Zellen weniger empfindlich gegenüber dem Wachstumsfaktor geworden sind, verglichen mit HERC/N2-Zellen. Sowohl die Deletionsmutante HERCD-533 wie auch die Punktmutante HERK721A (Fig. 1) zeigten ähnliche Effekte auf das von dem EGF-Wildtyp-Rezeptor vermittelte Zellteilungssignal und verursachten eine zehnfache Zunahme der ED₅₀ auf 6,6 ng/ml EGF. Im Gegensatz dazu hatte die Superinfektion mit NTK-HERCD-566 Virus keinen signifikanten Effekt auf die von dem Wildtyp-Rezeptor stimulierte DNA-Synthese durch EGF (Fig. 3C).

Antionkogene Aktivität der EGF-Rezeptormutanten

Es ist bekannt, daß die Überexpression des EGF-Rezeptors eine EGF-abhängige Zelltransformation von NIH 3T3 Zellen verursacht, wie beschrieben in Di Fiore, P.P. et al (1987), Cell, 51, 1063-1070, Velu, T.J. et al (1987), Science, 237, 1408-1410 und Riedel, H. et al (1988) Proc. Natl.

- 23 -

Acad. Sci., USA, 85, 1477-1481. Um zu untersuchen, ob das transformierende Potential von überexprimiertem EGF-Rezeptor gehemmt werden kann durch EGF-Rezeptor-mutanten, wurde EGF-Rezeptor coexprimiert mit Rezeptor-mutanten, und anschließend wurde ihre Fähigkeit, Kolonien in Weichagar oder Foci in einer Monolayer-Zellkultur zu erzeugen, untersucht. Die Stimulation von überexprimiertem EGF-Rezeptor wurde entweder durch EGF-Zusatz zu dem Medium erzielt, oder durch Infektion mit einem Virus (Ψ 2TGF α), das eine TGF- α DNA trägt, um ein autokrines Aktivierungssystem zu erzeugen (Tabelle; 1 durchschnittliche Werte aus vier Experimenten sind gezeigt).

Nach Infektion mit dem NTK-HERc Virus und der N2-Kontrolle bildeten NIH 3T3 Zellen ungefähr 250 Kolonien in Weich-Agar in der Anwesenheit von 10 ng/ml EGF. Durch Coinfektion mit Ψ 2TGF α -Virus wurde die Bildung von 148 Kolonien unter ansonsten identischen Bedingungen (Tabelle 1) erzielt. Jedoch wenn die mit dem EGF-Rezeptor infizierten Zellen mit entweder NTK-HER-K721A oder NTK-HERCD-533 Viren superinfiziert wurden, wurde die koloniebildende Kapazität fast vollständig unterdrückt. Die Coexpression des EGF-Rezeptors mit der extrazellulären Domäne HERCD-566 reduzierte die koloniebildende Fähigkeit um ungefähr 50% bei Stimulation mit 10 ng/ml EGF in der Agar-Schicht, und um ungefähr 33% bei Stimulation durch das autokrine TGF nach Infektion mit Ψ 2TGF α -Virus.

Auf ähnliche Weise wurde das Fokus-bildende Potential des NTK-HERc-Virus in NIH 3T3 Monolayer-Kulturen bestimmt, entweder in der Anwesenheit von 10 ng/ml EGF, was zu 920 Foci pro 10^6 Viren führte, oder nach Coinfektion mit

Ψ 2TGF α -Virus, was zu 480 Foci pro 10^6 NTK-HERc Viren führte. Superinfektion mit NTK-HERK721A oder NTK-HERCD-533 Viren unterdrückte die Anzahl der Foci um 100% bzw. 90%,

- 24 -

wenn die Stimulation mit EGF erfolgte, und um 75% bzw. 71% bei Stimulation mit dem Ψ 2TGF α -Virus (Tabelle 2).

Zellen, die den EGF-Wildtyp-Rezeptor und HERCD566 coexprimierten, zeigten die gleiche Anzahl an Foci wie Zellen, die den EGF-Rezeptor exprimierten und mit dem Kontrollvirus N2 infiziert waren. Dieses Ergebnis wurde sowohl bei der Stimulation mit EGF wie auch mit dem Ψ 2TGF α -Virus beobachtet.

Aus den obigen Ausführungen ist ersichtlich, daß die EGF-Rezeptormutanten sowohl ein deutliches antiproliferatives wie auch antionkogenes Potential besitzen und somit hervorragend für die Behandlung von Krebs geeignet sind.

- 25 -

Tabelle 1: Koloniebildung in Weichagar

Infektion	Anzahl der Kolonien /10 ⁶ CFU	
	+10 ng/ml EGF + Ψ 2TGF α	
N2	0	0
NTK-HERK721A	0	0
NTK-HERCD-533	0	0
NTK-HERCD-566	0	0
NTK-HERc/N2	246	148
NTK-HERc/NTK-HERK721A	8	2
NTK-HERc/NTK-HERCD-533	6	4
NTK-HERc/NTK-HERCD-566	128	100

Die Kolonien wurden nach 4 Wochen gezählt. Die Werte stellen Durchschnittswerte aus vier unabhängigen Experimenten dar. CFU bedeutet Kolonie-bildende Einheiten.

- 26 -

Tabelle 2: NIH 3T3 Focusbildung

Zelllinie	Anzahl der Foci/10 ⁶ CFU	
	+10 ng/ml EGF	+ Ψ 2TGF α
N2	0	0
NTK-HERK721A	0	0
NTK-HERCD-533	0	0
NTK-HERCD-566	0	0
NTK-HERc/N2	920	480
NTK-HERc/NTK-HERK721A	40	18
NTK-HERc/NTK-HERCD-533	90	14
NTK-HERc/NTK-HERCD-566	910	500

Die Foci wurden nach 14 - 16 Tagen gezählt. Die Werte stellen Durchschnittswerte aus vier unabhängigen Experimenten dar. CFU bedeutet Kolonie-bildende Einheiten.

Patentansprüche

1. Mutierte Rezeptortyrosinkinase, die keine Signalübertragungsaktivität mehr besitzt.
2. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er die Tyrosinkinaseaktivität des entsprechenden Wildtyp-Rezeptors nicht mehr besitzt.
3. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Deletion in seiner Tyrosinkinasedomäne trägt.
4. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Punktmutation in seiner Tyrosinkinasedomäne trägt.
5. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor seine extrazelluläre Domäne und seine Transmembranregion enthält.
6. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor eine extrazelluläre Domäne umfaßt.
7. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die extrazelluläre Domäne und die Transmembranregion von dem Wildtyp stammen.
8. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die extrazelluläre Domäne von dem Wildtyp stammt.
9. Mutierter Rezeptor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der mutierte Rezeptor ein

- 28 -

Wachstumsfaktorrezeptor ist.

10. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein mutierter Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ist.
11. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein mutierter Rezeptor für den von Blutplättchen stammenden Wachstumsfaktor (PDGF) ist.
12. Mutierter Rezeptor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein mutierter HER2-Rezeptor ist.
13. Mutierter Rezeptor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein met-Rezeptor ist.
14. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Punktmutation in Aminosäureposition 721 der EGF-Wildtyp-Rezeptorsequenz befindet.
15. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Punktmutante einen Alaninrest in Aminosäureposition 721 trägt und hinterlegt ist unter DSM 6678 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen.
16. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die 533 C-terminalen Aminosäuren des EGF-Wildtyp-Rezeptors deletiert sind.

- 29 -

17. Mutierter Rezeptor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die 566 C-terminalen Aminosäuren des EGF-Wildtyp-Rezeptors deletiert sind und der hinterlegt ist unter DSM 6680 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend den Rezeptor nach einem der Ansprüche 1 bis 17.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor mit Liposomen assoziiert ist.
20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung die mutierten Rezeptoren in der Form eines oder mehrerer rekombinanter Vektoren, die für den bzw. die Rezeptoren codierende Nukleinsäurefragmente tragen, enthält.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein rekombinanter retroviraler Vektor ist.
22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der retrovirale Vektor ausgewählt wird aus pNTK-HER-K721A und pNTK-HERCD-533, hinterlegt unter DSM 6678 und DSM 6679 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen.
23. Verfahren zum Behandeln eines an Krebs erkrankten Menschen oder Tiers, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge der pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 22.

- 30 -

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Krebs das Ergebnis einer Überfunktion von Rezeptortyrosinkinasen ist.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Krebs ausgewählt ist aus Brustkrebs, Ovarienkrebs und Lungenkrebs.
26. Verfahren zum Behandeln von auf Hyperplasie beruhenden Krankheiten des Menschen oder Tiers, die durch die Überfunktion von Rezeptortyrosinkinasen gekennzeichnet sind, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge der pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 22.
27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Krankheit Psoriasis ist.

1/3

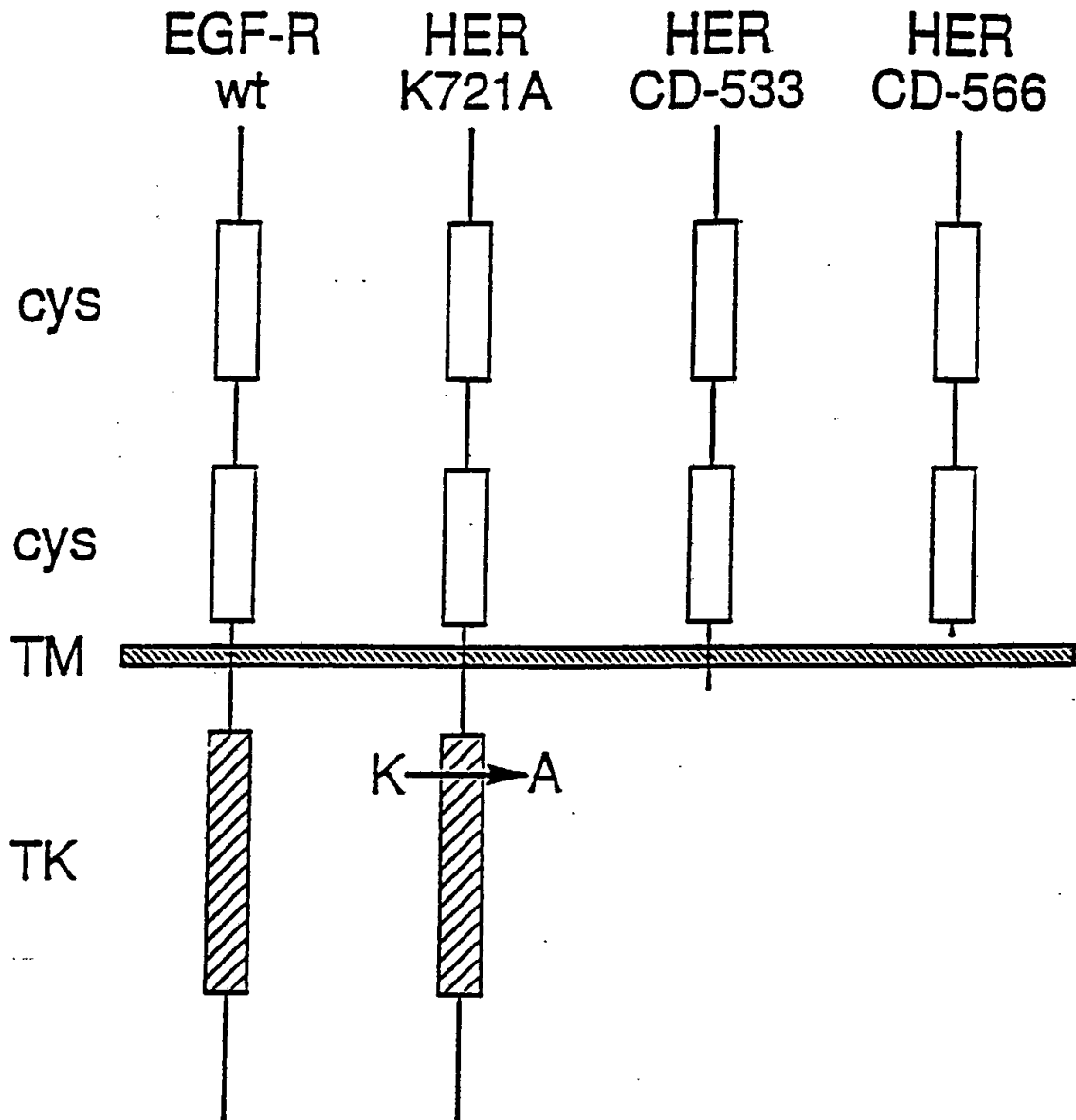


Fig. 1

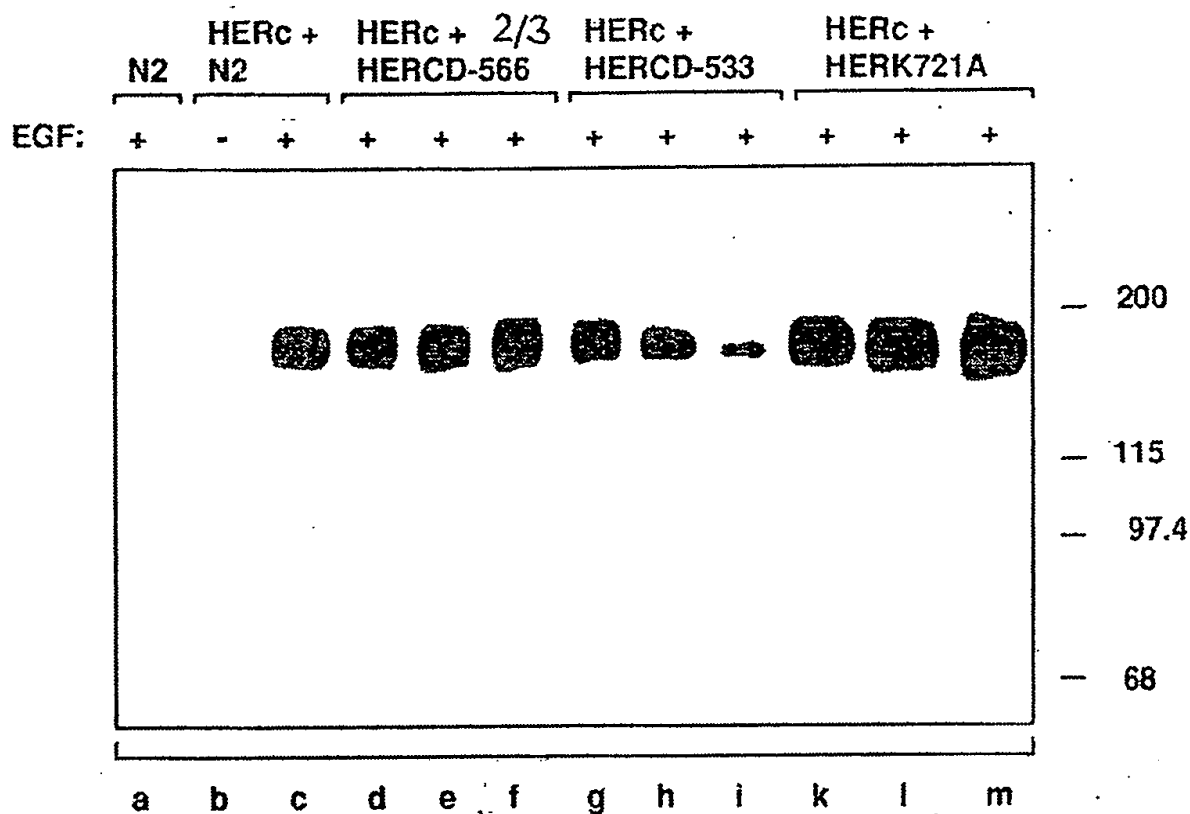


FIG. 2a

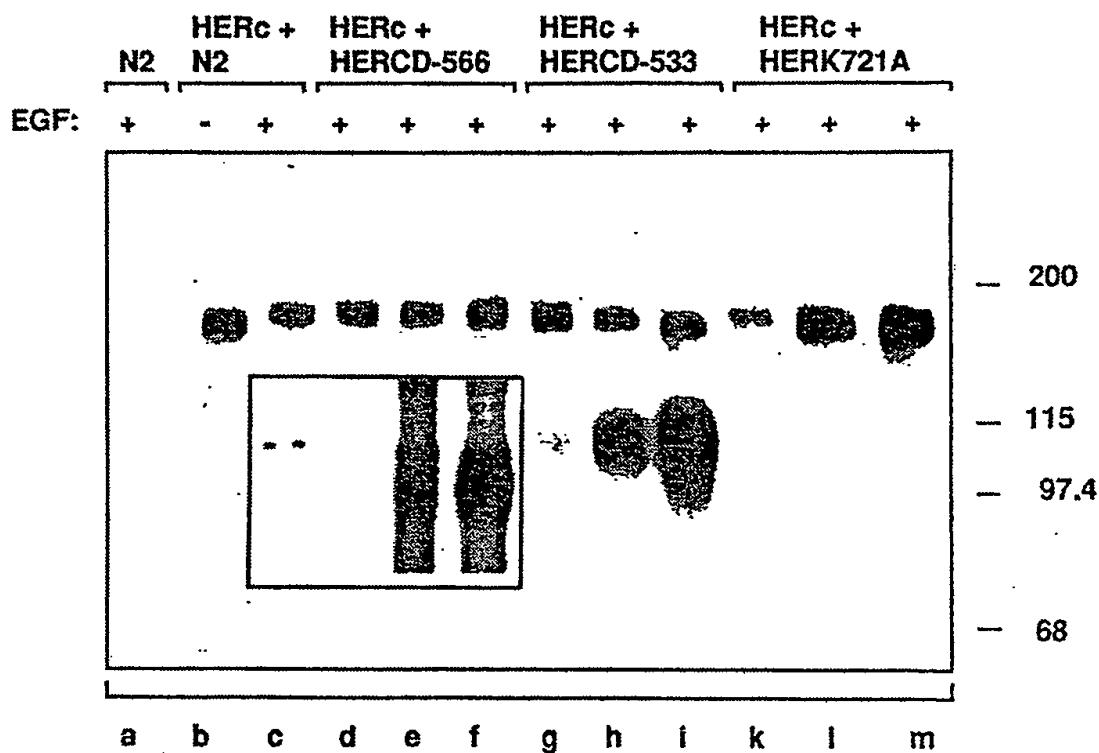


FIG. 2b

3/3

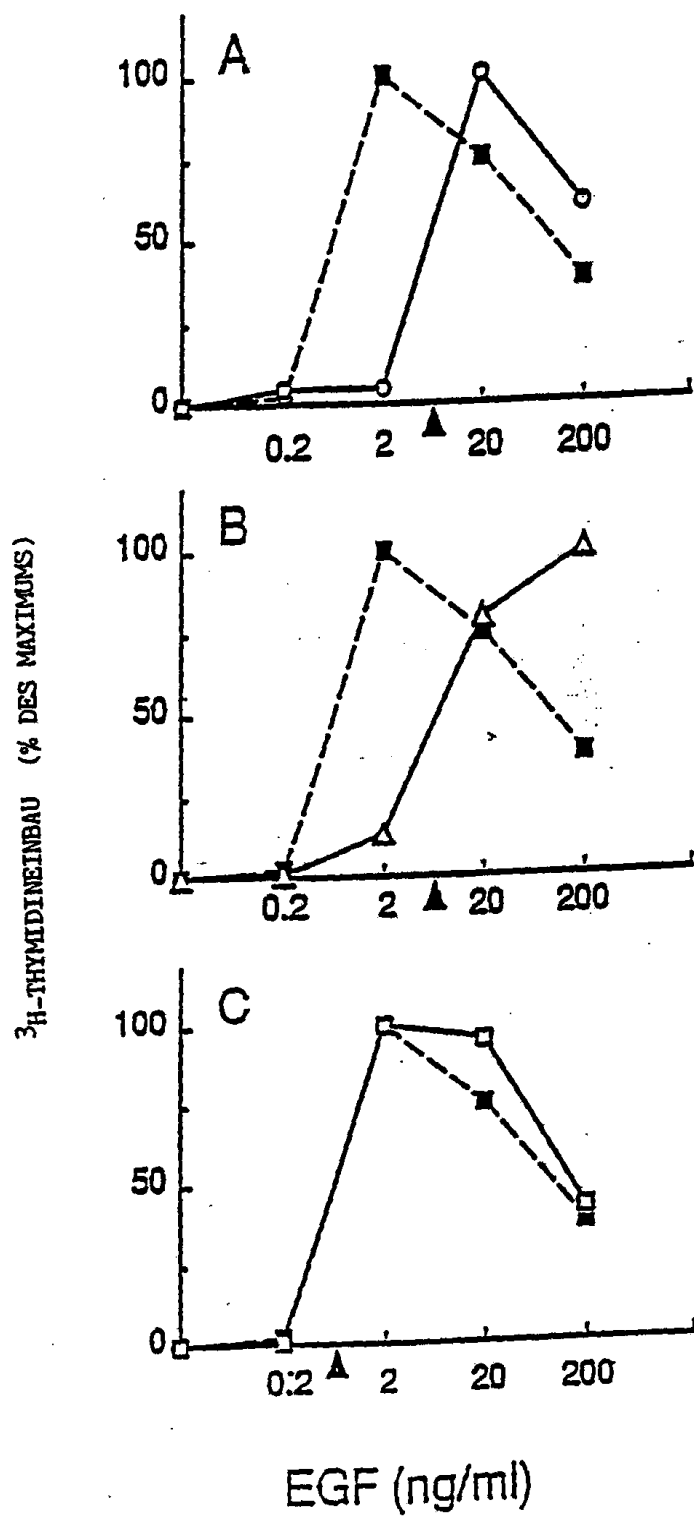


Fig. 3

ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ C12N9/12; C07K15/00; A61K37/02; A61K9/127
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ C07K ; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 11, No. 3, March 1991, WASHINGTON DC, US pages 1454 - 1463 O.KASHLES ET AL. 'A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization.' see abstract; figure 1	1-3,5,7 9-13,16, 18,23-27
Y	—	20-22
Y	THE EMBO JOURNAL vol. 7, No. 9, September 1988, OXFORD, GB T. VON RUDEN ET AL. 'Expression of functional human EGF receptor on murine bone marrow cells.' cited in the application see abstract; figure 1	20-22
	— ./.	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 December 1992 (03.12.92)

Date of mailing of the international search report

15 December 1992 (15.12.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02058

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 11, No. 1, January 1991, WASHINGTON DC, US pages 134 - 142 M. HEIDARAN ET AL. 'Deletion or substitution within the alpha platelet-derived growth factor receptor kinase insert domain: Effects on functional coupling with intracellular signalling pathways.' see abstract</p>	1-3,5,7, 9,11
X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 7, No. 12, December 1987, WASHINGTON DC, US pages 4568 - 4571 A. HONEGGER ET AL. 'A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis.' see abstract</p>	1,2,4,5, 7,9,10, 14,15
X	<p>WO,A,9 014 357 (GENENTECH, INC.) 29 November 1990 see the whole document</p>	1,2,6,8, 9,12,18 20,23-26
X	<p>WO,A,9 008 160 (IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD.) 26 July 1990 see page 26, line 28 see claims</p>	1,2, 9-13, 18-20, 23-27
P,X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, No. 2, February 1992, WASHINGTON DC, US pages 491 - 498 N. REDEMANN ET AL. 'Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants.' see the whole document</p>	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02058

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although Claims 23-27 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9202058
SA 64192**

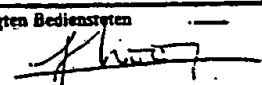
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 03/12/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9014357	29-11-90	EP-A- 0474727	18-03-92
WO-A-9008160	26-07-90	None	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 92/02058

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGS-GEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N9/12; A61K48/00	C07K15/00;	A61K37/02; A61K9/127
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C07K ; A61K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Bd. 11, Nr. 3, März 1991, WASHINGTON DC, US Seiten 1454 - 1463 O. KASHLES ET AL. 'A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization.' siehe Zusammenfassung; Abbildung 1	1-3,5,7, 9-13,16, 18,23-27
Y	---	20-22
Y	THE EMBO JOURNAL Bd. 7, Nr. 9, September 1988, OXFORD, GB T. VON RUDEN ET AL. 'Expression of functional human EGF receptor on murine bone marrow cells.' in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung; Abbildung 1	20-22
<p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
03.DEZEMBER 1992		15.12.92
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT		NOOIJ F.J.M. 

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Bd. 11, Nr. 1, Januar 1991, WASHINGTON DC, US Seiten 134 - 142 M. HEIDARAN ET AL. 'Deletion or substitution within the alpha platelet-derived growth factor receptor kinase insert domain: Effects on functional coupling with intracellular signalling pathways.' siehe Zusammenfassung	1-3,5,7, 9,11
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Bd. 7, Nr. 12, Dezember 1987, WASHINGTON DC, US Seiten 4568 - 4571 A. HONEGGER ET AL. 'A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis.' siehe Zusammenfassung	1,2,4,5, 7,9,10, 14,15
X	WO,A,9 014 357 (GENENTECH, INC.) 29. November 1990 siehe das ganze Dokument	1,2,6,8, 9,12,18, 20,23-26
X	WO,A,9 008 160 (IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD.) 26. Juli 1990 siehe Seite 26, Zeile 28 siehe Ansprüche	1,2, 9-13, 18-20, 23-27
P,X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Bd. 12, Nr. 2, Februar 1992, WASHINGTON DC, US Seiten 491 - 498 N. REDEMANN ET AL. 'Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants.' siehe das ganze Dokument	1-27

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 23-27 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9202058
SA 64192

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

03/12/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9014357	29-11-90	EP-A- 0474727	18-03-92
WO-A-9008160	26-07-90	Keine	

EPQ FORM P043

